

(11)Publication number : 56-106598

(43)Date of publication of application : 24.08.1981

(51)Int.Cl.

C12P 13/10  
 //(C12P 13/10  
 C12R 1/185 )

(21)Application number : 55-009760

(71)Applicant : AJINOMOTO CO INC

(22)Date of filing : 30.01.1980

(72)Inventor : MOMOSE HARUO  
 ISHIDA MASAOKI  
 TERABE MASATO

# (54) PREPARATION OF L-ARGININE BY FERMENTATION METHOD

## (57)Abstract:

PURPOSE: To collect the aimed substance in a culture medium, by cultivating a variant strain, belonging to the genus Escherichia, and having the resistance to  $\alpha$ -methylmethionine, D-arginine,  $\alpha$ -methylserine, etc.

CONSTITUTION: A variant strain of a microorganism, belonging to the genus Escherichia, and having the resistance to  $\alpha$ -methylmethionine, p-fluorophenyl-alanine, D-arginine, argininehydroxamic acid, S-(2-aminoethyl)-cysteine,  $\alpha$ -methylserine,  $\beta$ -2-thienylalanine or sulfaguanidine, e.g. Escherichia coli AJ11531 Escherichia coil AF11538, is cultivated. Among them, a variant whose L-arginine synthetic control gene is inactivated has a high L-arginine producing activity. The variant is cultivated in an ordinary culture medium under ordinary culture conditions, and the L-arginine is collected from the culture fluid by the conventional method.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑯ Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 12 P 13/10  
2(C 12 P 13/10  
C 12 R 1/185)

識別記号 庁内整理番号  
6712--4B

⑰ 公開 昭和56年(1981)8月24日  
発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 4 頁)

⑱ 発明法による L-アルギニンの製造法

⑲ 特 願 昭55-9760  
⑳ 出 願 昭55(1980)1月30日  
㉑ 発 明 者 百瀬春生  
鎌倉市玉堤2-24-2  
㉒ 発 明 者 石田雅昭

川崎市川崎区観音2-20-8  
㉓ 発 明 者 寺郎真人  
横浜市緑区美しが丘1-14  
㉔ 出 願 人 味の素株式会社  
東京都中央区京橋1丁目5番8号

明 細 書

1. 発明の名称

発明法による L-アルギニンの製造法

2. 特許請求の範囲

(1) エンエリヒア菌に属し、L-ノルメチロニン、D-アルギニン、アルギニンヒドロキサン酸、5-(2-アミノエチル)-ノースタイン、L-ノルメチロニン、D-2-オキシニルアラニン、又はスルツアグアニンに耐性を有する菌株を培養し、培養液中に生成された L-アルギニンを回収することを特徴とする発明法による L-アルギニンの製造法。  
(2) 菌株が、エンエリヒア菌に属し、L-ノルメチロニン、D-アルギニン、アルギニンヒドロキサン酸、5-(2-アミノエチル)-ノースタイン、L-ノルメチロニン、D-2-オキシニルアラニン、又はスルツアグアニンに耐性を有するとともに、L-アルギニン生成能産生因子を失活せしめたものである

る特許請求の範囲第1項記載の発明法による L-アルギニンの製造法。

3. 発明の詳細な説明

この発明は発明法による L-アルギニンの製造法に関する。

発明法による L-アルギニンの製造法としては、プレバクタリウム属、コリスバクタリウム属、エンエリヒア属等の菌株を使用する方法が知られている(特公昭52-33113号)。

本発明者らは、エンエリヒア菌に属し、L-ノルメチロニン、D-アルギニン、アルギニンヒドロキサン酸、5-(2-アミノエチル)-ノースタイン、L-ノルメチロニン、D-2-オキシニルアラニン、又はスルツアグアニンに耐性を有する菌株の多くが、高い L-アルギニン生成能を有することを知った。これらの耐性菌株の菌株特性、L-アルギニン生成能産生因子を失活せしめた菌株がより高い L-アルギニン生成能を有する。



比活性は生産アルギニン (L-Arginine) によって表示。

しかも、あらかじめスベタノマイシン耐性株 (株 1) (7.2 分) と及びアミノ酸感受性株 (株 2) (4.4 分) が作られているので、高活性より低活性へと行われる。スベタノマイシン耐性株とアミノ酸感受性のコロニーをスベタノマイシン濃度 1.0 mg/ml の含有の最少増殖上で選択することにより、所定の  $arg^+$  株 (7.2 分) の製造された細胞増殖を分離することが出来る。

アルギニン合成阻害遺伝子に共通置換をもつた菌株では、通常に生産された L-アルギニンの存在にもかかわらずアルギニン合成阻害剤の合成が抑制 (レプレッション) を受けるので、L-アルギニンの生産性によって有利であるが、この L-アルギニンの分解活性を低下せしめる置換を含有させることも、生産性向上に利する。

次に、本発明に供する菌株の各菌株に対する比活性を表 1 に示した。

- 7 -

菌株 (株/4g)	コラーゲン産生	
DL-α-アミノアラニン	AJ 611522	K12
0	+	+
200	+	-
1000	-	-
D-アラニン	AJ 611533	K12
0	+	+
20000	+	-
L-アルギニンヒドロキシ化型	AJ 611534	K12
0	+	+
700	+	-
10000	-	-
D-2-アミノグルタミン酸	AJ 611535	K12
0	+	+
200	+	-
500	-	-

- 8 -

これらの結果は、D-セリスの最少増殖 (下記組成) の各菌株を中に示した置換によるに帰して固体増殖を作り、その上にアミノ酸感受性の菌株の増殖を促進した。3.7 で 3.8 増殖することにより、これらの L-アルギニン生産性の高活性株のコラーゲン産生 (+) として表示) を表 1 に比較したものである。

最少増殖組成 (1.0 ml) : グルコース 2.0 g (1.0 g/l), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.46 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.26 g, クエン酸ナトリウム 2.14 g, 0.5% MgSO<sub>4</sub> 0.74 g, 0.1% 亜鉛 2.4 g (0.1% 硫酸)

表 2. 各種アルギニン変異株の比活性

菌株 (株/4g)	コラーゲン産生	
DL-α-アミノアラニン	AJ 611531	K12
0	+	+
40	+	-
100	-	-

- 9 -

菌株 (株/4g)	コラーゲン産生	
DL-α-アミノアラニン	AJ 611532	K12
0	+	+
20000	+	-
D-2-アミノアラニン	AJ 611537	K12
0	+	+
200	+	-
1000	-	-
スルファダアミン	AJ 611538	K12
0	+	+
50	+	-
100	-	-

注: テロニン変異株から選出された菌株のため最少増殖中に L-テロニン 150 mg/l を添加。

- 10 -

本発明でいう蒸餾装置とは、上記地層を伴下し、ある程度蒸餾された蒸餾液を導いたとき点検であるエンエリミア・コリー・K12はココロー層液を示すものに対し、蒸餾液の方はココロー層液を示す場合をいう。

レーアルゲニウム生成のための培養地は特製飼料とす、炭素源、窒素源、銅源及び必要ならば有機酸類等を含有する通常の培養地が用いられる。炭素源として含水炭素（グルコース、シメツコース、フラクトース、ラクトース及びこれらを含むアンプルやグルコース等の加水分解物、麦芽、ホエイ等）、有機酸（酢酸、アミン酸等）、アルコール（グリセリン、エタノール等）が使用できる。窒素源としては、アンモニウム塩（硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、塩化アンモニウム）、アンモニアガス、アンモニア水等が使用できる。無機塩としては、リン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩、マンガン塩、銅量微量等が必要に応じて使用する。有機酸類炭素源としては、炭素源兼任のある場合

- 11 -

では酵母アミノ酸、ビタミン、塩類等、有機酸類等を添加量減し、必要に応じて炭素源炭素源としてアミノ酸、ビタミン及びこれらを含むアミノ加水分解物、酵母エキス、ペプトン、カゼイン酸等を使用する。

培養条件は通常の方式でよく、pHを7.0とし、温度は30°C以内とし、培養液を伴下し20をいし96時間培養すればよい。培養中KOHが下がる場合は、次期カルシウムを添加して加えるか、又はアンモニアガス、アンモニア水のアルカリで中和する。

レーアルゲニウムの培養液からの採取は常法により行うことができる。

実施例1.

グルコース 5g/4L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.0g/4L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g/4L, MgSO<sub>4</sub> 1H<sub>2</sub>O 0.1g/4L, 酵母エキス 0.05g/4L, ナイアシン塩酸塩 1.0g/4L, F=80, 7H<sub>2</sub>O 1mg/4L, Mn=80, 1H<sub>2</sub>O 1mg/4L, 硫酸カルシウム 2.0g/4L を含有し、レーアルゲニウム培養液を培養

- 12 -

する培養地については150mg/4Lのレーアルゲニウムを培養地に加した。pH 7.0 の水溶液培養地を300mlフラスコに20ml分注し、これに各培養液を1回添加し、一定温度一定時間培養した。培養終了時に得るレーアルゲニウムの量は表3の如くであった。

表3 レーアルゲニウム生成実験

培養液	培養温度 (°C)	培養時間 (hr)	レーアルゲニウム 産量 (mg/4L)
AJ 11531	31.5	96	130
AJ 11532	31	96	28
AJ 11533	31	72	19
AJ 11534	31	96	31
AJ 11535	31	72	24
AJ 11536	31.5	72	12
AJ 11537	31.5	84	7
AJ 11538	31.5	96	10

発明者 味の素株式会社

- 13 -